Al Chiar.mo Prof. P. Foà l'A

LABORATORIO D'ANATOMIA PATOLOGICA
DELLA R. UNIVERSITÀ DI PADOVA
diretto dal Prof. **A. BONOME**

Contribuzione allo Studio della FINA STRUTTURA DEL NUCLEO e del PROTOPLASMA

NOTA

del
Dott. TULLIO FERRARI
libero docente in Ostetricia e Ginecologia
assistente onorario dell'Istituto Ostetrico-Ginecologico
diretto dal Prof. G. INVERARDI

MILANO
TIPOGRAFIA CAPRIOLO E MASSIMINO
1895

LABORATORIO D'ANATOMIA PATOLOGICA
DELLA R. UNIVERSITÀ DI PADOVA
diretto dal Prof. A. BONOME

Contribuzione allo Studio della FINA STRUTTURA DEL NUCLEO e del PROTOPLASMA

NOTA
del

Dott. TULLIO FERRARI
libero docente in Ostetricia e Ginecologia
assistente onorario dell'Istituto Ostetrico-Ginecologico
diretto dal Prof. G. INVERARDI

MILANO
TIPOGRAFIA CAPRIOLO E MASSIMINO
1895

In causa della ristrettezza del locale che nell'Istituto Ostetrico-Ginecologico è destinato ad uso di laboratorio, io ho fatto queste mie ricerche nell'Istituto Anatomo-Patologico, nel quale il prof. Bonome, avendo, dietro mia richiesta, gentilmente messo a mia disposizione un abbondante materiale di studio, mi offrì l'occasione a parecchie interessanti osservazioni.

Sicuro che gli studiosi di citologia faranno buon viso ad un metodo di ricerca, il quale, oltre a mettere in chiara evidenza i granuli protoplasmatici (bioblasti di Altmann, plastiduli di Maggi e di Zoia, plasomi di Wiesner) dimostra la morfologia del nucleo con una chiarezza veramente eccezionale (granuli nucleari, carioblasti di Altmann); convinto che uno dei metodi che io propongo, permettendo di utilizzare per queste fini ricerche microscopiche anche il materiale già da tempo raccolto, potrà notevolmente allargare il campo delle indagini istologiche, espongo in questa nota le modificazioni e le aggiunte da me portate al metodo di Altmann (1), colla speranza che queste vorranno essere esperimentate e controllate da altri osservatori.

Quantunque dopo ripetuti tentativi sia riuscito col metodo proposto da Altmann ad ottenere delle immagini abbastanza chiare dei granuli protoplasmatici, devo confessare che, tanto per la delicatezza della tecnica proposta da questo autore per tale dimostrazione, quanto per la parziale reazione che con questa si ottiene

---

(1) Altmann R., *Die Elementarorganismen und ihre beziehungen zu den zellen*, Leipzig, 1890.

(sui soli granuli del protoplasma) io non mi trovai del tutto soddisfatto di tal metodo di ricerca.

Se le immagini che si possono ottenere seguendo il primo metodo proposto da Altmann (1), per la loro chiarezza ed evidenza hanno portata una gran luce nello studio della struttura del protoplasma cellulare, ciò non toglie che, essendo la reazione localizzata alle sole parti morfologiche di questo, noi non possiamo avere con tal metodo quel giusto concetto in toto della cellula quale si può avere con una reazione la quale, pur dimostrando i dettagli di struttura del protoplasma, mette in evidenza la fina struttura del nucleo colla massima chiarezza.

L'osservazione contemporanea tanto di quelle parti della cellula che in essa sono destinate alla funzione nutritiva, (forma disposizione, composizione dei granuli protoplasmatici) quanto di quelle altre parti che si incaricano specialmente della funzione di riproduzione (forma disposizione e composizione dei granuli nucleari) permetterà certamente di apprezzare meglio certi fatti i quali, se fino ad ora si potevano in certo qual modo intuire, non si potevano però chiaramente dimostrare.

I tentativi fatti dallo stesso Altmann (2) per unire contemporaneamente in un preparato alla dimostrazione dei granuli protoplasmatici quella dei granuli nucleari, sono finora poco promettenti, perchè tanto per la tecnica poco ben tracciata, quanto per la incertezza e la poca chiarezza delle immagini che si ottengono col metodo proposto a tale scopo (3), il ricercatore resta il più delle volte nella più completa disillusione.

Partendo dall'idea che la reazione di Altmann avvenga sui soli granuli protoplasmatici perchè le miscele fissatrici adoperate

---

(1) Altmann, loco citato.

(2) Altmann, *Ueber Kernstructur und Netzestructuren* (*Arch. f. Anat. und. Phys. Abth.*, 1892.

(3) Nota I. Quantunque Altmann in una sua ulteriore memoria dica di essere riuscito coll'aggiunta della cianina a colorare contemporaneamente i bioblasti ed i carioblasti, pure, essendo troppo vaga la descrizione che questo A. dà del metodo seguito, nessuno, a mia conoscenza, potè fin ora trar profitto dalle sue ricerche.

da questo A. non fissano i granuli nucleari in un modo conveniente, ho creduto logico di provare per la fissazione dei pezzi un altro liquido fissatore il quale meglio potesse servirmi allo scopo. Il liquido che primo mi venne alla mente, fu quello di Hermann ed il processo intiero che, dopo parecchie modificazioni, ho creduto di adottare è il seguente:

Piccoli pezzi freschi di organi appena tolti dall'animale, dello spessore non eccedente quello di due millimetri, vengono mantenuti per 24 ore nel liquido di Hermann; lavati poi per un tempo sufficiente nell'acqua corrente (da 24 a 36 ore), vengono passati nella serie degli alcool ad 80^0, 90^0, e 100^0, poi in xilolo ed alcool (50 $^0/_0$), in xilolo puro e finalmente in paraffina, tenendoli circa 3 ore in ciascuno di questi liquidi.

Le sezioni che si richiedono per la dimostrazione sono assai fini, perchè in queste solo si possono rilevare tutti quei dettagli di struttura che può dimostrare la reazione. Applicate le sezioni al vetrino porta-oggetti colla traumaticina ovvero coll'albume di Mayer, si scalda il preparato, e, dopo aver tolta la paraffina con xilolo e questo con alcool assoluto, si passa alla colorazione. Questa si può praticare colla stessa soluzione proposta da Altmann (soluzione al 25 $^0/_0$ di fuxina acida in acqua fortemente anilinata), scaldando prima il preparato finchè si svolgono abbondanti vapori, poi lasciando raffreddare per un po' di tempo la preparazione. Migliori e più completi risultati, io li ottenni adoperando una miscela di parti eguali di fuxina acida al 25 $^0/_0$ e di verde di metile al 10 $^0/_0$ in acqua pure fortemente anilinata. Adoperando questa miscela i granuli nucleari si colorano in bleu e quelli protoplasmatici in rosso.

Il differenziamento del preparato, lo si può pure ottenere adoperando il liquido di Altmann (una parte di soluzione alcoolica satura di acido picrico addizionata di due parti di acqua distillata). Io in genere mi trovai molto meglio adoperando soluzioni più deboli. Con queste soluzioni si lava prima a freddo il preparato per togliere l'eccesso di colore che resta sul porta-oggetti, e poi a caldo (finchè si innalzano i primi vapori) si ottiene il differenziamento voluto. Se si è adoperata per la colorazione la sola fuxina, il differenziamento riesce più facile, perchè si fa cessare l'azione del decolorante quando il preparato ha assunto un color rosso-mattone; ma

se la colorazione si è fatta colla miscela di fuxina e di verde la operazione diventa un po' più delicata, perchè dopo aver agito sul preparato colla soluzione picrica per togliere l'eccesso di fuxina, si ottiene una colorazione verde, la quale ancora può velare un eccesso di fuxina che al momento non appare. Per togliere l'eccesso di verde bisognerà andare ben cauti, perchè questo calore, per poco che si faccia agire l'alcool assoluto, può essere completamente esportato. A questo riguardo diremo che, meglio che ogni descrizione, vale provare « errando discitur ». Decolorata e disidratata con alcool assoluto la preparazione, la si asciuga con carta bibula e poi la si chiarifica in xilolo e damar.

Con questo procedimento ho potuto colorare contemporaneamente, in modo assai dimostrativo, i carioblasti ed i bioblasti nelle fibre muscolari del cuore e nelle fibre muscolari di un utero di donna che portava un epitelioma del canale cervicale, caso questo in cui ottenni nello stesso tempo una chiara dimostrazione della degenerazione grassa delle fibre muscolari circostanti alla neoplasia. Nel fegato, nei reni, nella milza, nelle capsule surrenali, nella placenta e nell'utero puerperale (organi che io ho studiato per certe loro modificazioni sperimentali in un lavoro in corso) pure ottenni dal metodo ora descritto risultati insperati.

Spinto dal desiderio di avere la reazione dei bioblasti su certi elementi che io aveva riscontrati in pezzi conservati nel liquido di Müller, elementi dei quali, colle solite reazioni di micro-chimica, non era riuscito a comprendere il vero significato, ottenni risultati eccellenti dal metodo seguente:

Piccoli pezzi di organi conservati nel liquido di Müller vengono per ventiquattro ore lavati in acqua corrente e poscia messi per un tempo eguale nel liquido di Hermann (1). *In seguito si assoggettano agli stessi trattamenti ora descritti per i pezzi fissati direttamente in Hermann.*

Gli organi sui quali fin ora ho provato questo secondo metodo sono: l'utero, le ovaie, gli ovidotti e la placenta, tanto di donna

---

(1) Nota II. Anche con altri liquidi fissatori ho già ottenuto sui pezzi conservati nel liquido di Müller dei risultati eccellenti; non mi pronuncio però ancora sul valore di questi avendo tali prove bisogno di ulteriori conferme.

quanto di coniglia. Oltre a questi visceri nel lavoro sperimentale in corso, già citato, ho pure studiato nel coniglio i reni, il fegato, la milza, le capsule surrenali ed il midollo spinale.

Tralasciando di descrivere dettagliatamente tutto quello che potei osservare in questi vari organi coll'applicazione dei due metodi ora descritti, perchè ciò mi farebbe uscire dai limiti ristretti che mi sono prefisso in questa nota, a sola conferma di tali metodi riassumerò in breve qualcuno fra i più importanti dei risultati ottenuti.

Elementi del sangue. — Specialmente nei pezzi tolti dal liquido di Müller e fissati successivamente in Hermann, i globuli rossi tanto nucleati (midollo delle ossa e fegato ematopoietici) quanto anucleati, appaiono spiccatamente e costantemente granulosi; il solo eccesso di acido picrico vela talvolta questo dettaglio di struttura. Le granulazioni che essi trattengono, assumono per lo più colla miscela di fuxina e di verde una tinta bleuastra, la quale resta sostituita da un colore rosso deciso ogni qual volta con una protratta decolorazione operata coll'alcool assoluto, il verde di metile sia stato completamente tolto dalla preparazione.

Le piastrine del sangue che si possono osservare tanto nei vasi sanguigni, quanto nei punti nodali di coaguli fibrinosi si colorano nello stesso modo e mostrano una struttura eguale a quella dei globuli rossi anucleati.

Nei leucociti tanto mono-nucleati, quanto poli-nucleati, sono sempre differenziabili i carioblasti, e, specialmente nei leucociti grandi mo-nucleati anche i bioblasti si mostrano colorati contemporaneamente con grande evidenza. Su questi costanti reperti ottenuti applicando i due metodi su esposti allo studio delle parti morfologiche del sangue nei tessuti, noi richiamiamo l'attenzione degli studiosi, poichè ci sembra notevole l'importanza che tali metodi potranno acquistare nello studio della genesi di certe alterazioni patologiche dei corpuscoli sanguigni.

Cuore. — In piccoli pezzi di cuore fissati nel liquido di Hermann e colorati colla soluzione di Altmann, sono colorabili assai facilmente i bioblasti degli elementi muscolari, i quali si mo-

strano disposti in serie lungo le fibrille delle quali questi sono composti. I carioblasti pure si mostrano contemporaneamente colorati colla massima evidenza e dànno nel loro insieme una immagine assai bene differenziata del nucleo.

Placenta. — Nella placenta della coniglia ottenni risultati assai dimostrativi sui pezzi fissati direttamente in Hermann e colorati colla miscela di fuxina e di verde; nei preparati trattati in questo modo, specialmente i bioblasti ed i carioblasti degli elementi deciduali appariscono colla massima chiarezza; anzi devo aggiungere che in questi stessi elementi i bioblasti sono così abbondanti e così intensamente colorabili che mascherano (nelle sezioni non sufficientemente sottili) i carioblasti, ad onta che questi alla lor volta si colorino in un modo assai differenziato ed intenso. I granuli nucleari si possono del resto sempre distinguere dai granuli protoplasmatici per i seguenti caratteri: *a*) perchè essendo essi meno stipati, limitano chiaramente nella cellula lo spazio più chiaro di forma ovale (spazio nucleare) nel quale sono trattenuti; *b*) perchè a differenza dei bioblasti essi hanno proporzioni fra loro assai differenti; *c*) perchè colla miscela di fuxina e di verde anzi che assumere un colore rosso deciso come i bioblasti, tendono ad assumere un colore bleuastro.

Fibre elastiche. — Nei pezzi tolti dal liquido Müller e fissati nuovamente in Hermann, le fibre elastiche si colorano assai intensamente colla fuxina, tanto che spiccano nel preparato sopra ogni altro elemento. La tinta che esse assumono però mi è parsa costantemente omogenea; non posso quindi in questi elementi parlare di speciali dettagli di struttura.

Sostanza grigia. — Sopra un piccolo pezzo di midollo spinale di coniglio che da due mesi stava nel liquido di Müller e che io previa lavatura in acqua corrente fissai di nuovo in Hermann, tanto colla fuxina acida pura, quanto colla miscela di fuxina e di verde, tutti gli elementi della sostanza grigia ed i loro prolungamenti protoplasmici, mi apparirono costantemente tempestati di piccole granulazioni tinte fortemente in rosso, le quali spiccano in un modo assai

elegante in mezzo al color giallognolo lasciato dall'acido picrico alla preparazione. Questa reazione che si ottiene sopra gli elementi della sostanza grigia, messa a confronto con quella che si può ottenere su altri elementi collo stesso metodo, mi è parsa la più tenace e costante, poichè la differenziazione coll' acido picrico ben difficilmente riesce a togliere ai granuli protoplasmatici dei primi il loro colore rosso, facendola agire per un tempo anche abbastanza lungo.

Per non dilungarmi troppo tralascio di descrivere ciò che coll'applicazione dei due metodi in discorso potei osservare nell'utero, nelle trombe di Fallopio, nelle ovaie, nelle capsule surrenali e nei reni, limitandomi a dire qualche cosa del fegato, organo sul quale specialmente fu richiamata la mia attenzione.

Fegato. — Nei pezzi conservati nel liquido di Müller e fissati di nuovo in Hermann, facendo uso come sostanza colorante della sola fuxina acida, i risultati che si ottengono sono assolutamente eguali a quelli che si ottengono col metodo classico di Altmann (1). I bioblasti cioè delle cellule epatiche appariscono colorati in rosso colla massima evidenza ed il nucleo di questi elementi è rappresentato da uno spazio ovale o rotondo di color giallo-sporco, nel centro del quale resta talvolta colorato un corpicciuolo rotondo grosso più di un bioblasta (nucleolo). Se la colorazione vien fatta con una miscela di fuxina, di verde e di horange, il nucleo assume una tinta diffusa di colore horange nella quale spicca talvolta qualche granulazione di color verdastro (carioblasta); i bioblasti in questo caso appariscono meno evidenti perchè l'horange colorando debolmente il paraplasma toglie loro la nettezza dei contorni.

In un fegato normale, le cellule epatiche trattengono nel loro protoplasma bioblasti di forma rotonda, fortemente colorabili, di volume pressochè uniforme e distribuiti specialmente intorno al nucleo ove formano una corona quasi continua. Quando il parenchima epatico, dietro uno stimolo si intorbita, se l'intorbidamento è forte, il protoplasma tutto assume un colorito rosso intenso in mezzo al quale non sono più discernibili i singoli granuli; se per-

(1) Altmann, loco primo citato.

dura intenso lo stimolo e la cellula cade in necrobiosi, le granulazioni rigonfie e sformate si fanno sempre meno colorabili finchè la loro presenza nel protoplasma non è più dimostrabile ed i limiti della cellula non più bene tracciati, mostransi frastagliati e scuri. Specialmente col primo dei due metodi esposti queste alterazioni del protoplasma si possono studiare con facilità contemporaneamente alla morfologìa del nucleo.

Negli elementi in cariocinesi la sostanza protoplasmatica si mostra sempre omogenea e non tingibile, o tutto al più vi si possono osservare degli scarsi bioblasti alla periferia, verso il contorno cellulare. Quest'ultimo fatto lo osservai frequentemente nei epitelii renali di conigli, ai quali iniettai nel cavo addominale da 4 a 6 cent. c. di una soluzione di bleu di metylene all' $^{1}/_{500}$. In tali animali il processo distruttivo apportato sugli elementi renali dall'eliminazione di questo colore d'anilina, è associato ad una tumultuosa neoformazione degli elementi epiteliali in cui le forme di mitosi sono oltremodo evidenti ed abbondanti.

Colla speranza che la descrizione di questi reperti vorrà spingere qualche ricercatore a provare e controllare i metodi di ricerca da noi proposti, faccio cenno brevemente delle indicazioni speciali di ciascuno di essi e delle cause che possono renderne poco attendili i risultati:

a) Nei pezzi fissati direttamente nel liquido di Hermann la reazione è oltremodo chiara e completa, tanto adoperando nella colorazione la fuxina sola, quanto adoperando la miscela di fuxina e di verde. È utile però che facciamo osservare che perchè questa reazione riesca è necessario che i pezzi siano molto piccoli, perchè in quei punti in cui il liquido fissatore non ha ben compenetrato i tessuti, la reazione od è incompleta (sui soli granuli nucleari) o manca affatto.

b) Volendo ottenere una differenziazione più netta tra i granuli nucleari ed i granuli protoplasmatici, è utile ricorrere alla miscela di fuxina e di verde, poichè con questa i bioblasti si tingono in rosso ed i carioblasti in un colore che tende al bleu. Per avere questo risultato è necessario sorvegliare attentamente la differenziazione del preparato coll'alcool assoluto, perchè con questo reagente il verde con molta facilità può essere esportato completamente

dalla preparazione. Il colore bleuastro assunto dal verde nei preparati credo sia dovuto all'acidità della fuxina alla quale viene associato.

c) I pezzi che dal liquido di Müller si passano poi nel liquido di Hermann possono essere di un discreto volume, perchè stando a quello che noi abbiamo potuto osservare, la preventiva permanenza in Müller aumenta la penetrabilità per il secondo reattivo. Questo vantaggio già notevole presentato dal metodo, aggiunto a quell'altro, forse più importante, offertoci dallo stesso, che è quello di permetterci le più fini ricerche istologiche su pezzi conservati in un liquido poco costoso e comunemente usato, voglio sperare raccomanderà ai ricercatori la proposta che noi facciamo.

d) Potendosi talora ottenere dei risultati negativi in causa della impurità del bicromato che entra a far parte del liquido di Müller, per garantirci contro ogni eventuale disillusione, noi consigliamo di provare le prime volte su pezzi conservati in un liquido di Müller ben preparato e soventi volte cambiato. Sarà pure utile di provare le prime volte su pezzi di fegato e di midollo spinale, poichè secondo quello che risulta dalle nostre osservazioni, la reazione su tali organi avviene con maggior sicurezza.

e) La fissazione diretta in liquido di Hermann è sempre da preferirsi all'altra in quei casi in cui più interessano i dettagli di struttura del nucleo, il quale nei pezzi stati in Müller si colora un po' diffusamente.

Dott. Tullio Ferrari.

Padova, 4 Aprile 1895.